

Ultra Rapid Real-Time PCR에 의한 Human Immunodeficiency Virus (HIV)의 신속진단법

이동우 · 김을환 · 유미선 · 한상훈 · 윤병수*

경기대학교 자연과학대학 생명과학과

인간면역결핍바이러스(Human immunodeficiency virus; HIV) 진단을 위한 다중, 초고속 실시간 PCR법을 개발하였다. 검출 대상의 DNA 염기서열은 *env* 유전자를 기반으로 설계되었으며, 각기 HIV-1 특이 495염기(gi_1184090) 및 HIV-2 특이 294염기(gi_1332355)의 DNA를 안정상의 이유로 PCR을 이용한 유전자합성법으로 제작하여 사용하였다. 초고속 실시간 PCR은, PCR의 회전 중 각 단계별 설정시간을 극단적으로 축소하여, 1 µl의 PCR 용액용 microchip을 탑재할 수 있는 Genspector™을 사용하여 수행하였다. DNA 증폭과 융점분석을 포함한 총 PCR 검색 시간은 HIV-1 및 HIV-2 모두에서 15분 이내로 완료되었으며, 각기 최소 2.3개의 합성 *env* 유전자로부터도 HIV-1 특이 117염기와 HIV-2 특이 119염기의 PCR 산물을 성공적으로 증폭시킬 수 있는 민감성을 보여주었다. 이런 형식의 실시간 PCR법을 본 연구에서 초고속 실시간 PCR (Ultra-rapid real-time PCR)이라 명명하였다. 이는 본 연구의 대상인 HIV에 대한 보조적 진단방법일 뿐 아니라 PCR 검색법이 사용되고 있는 다른 병원체에 대하여도 적용될 수 있을 것이나, 우선 HIV 임상치료에 대한 본 검색법의 효용성 실험 등 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Key words □ HIV, human immunodeficiency virus, rapid diagnosis, ultra-rapid real-time PCR

Human Immunodeficiency Virus (HIV)는 후천성 면역결핍 증후군(Acquired Immune Deficiency Syndrome)의 병인체(19), lentiviruses 속에 속해 있으며, 2006년의 조사에서 전 세계적으로 약 4,000만명이 HIV에 감염되어 있으며, 약 2,500만명의 사망자가 발생한 것으로 나타났다(20).

일반적으로 AIDS 감염자의 25-43%, 비감염자의 33-48%만이 그들의 진단 결과를 통보받았다고 보고되고 있다(3). 이러한 AIDS 진단 결과에 대한 낮은 인지도는 즉석 진단이 어렵기에 진단 결과를 통보하는 과정과 시간이 필요하기 때문이며, 이는 감염자 자신이 HIV 감염 여부를 인지하지 못하여 HIV를 확산시키는 결과를 초래한다. 따라서 신속한 진단 및 통보는 감염된 개인이 그들의 AIDS 감염 여부를 정확하게 인지하여 즉시 치료를 받을 수 있도록 하며, 더 나아가 HIV 전파를 감소시킬 수 있을 것이다(12).

이처럼 즉석진단, 즉 시료 채취부터 30분 이내에 감염 여부를 판정할 수 있는 진단법은 매우 중요한 것이나, 기존의 Enzyme immunoassay (EIA), western blot analysis와 같은 혈청학적 진단 방법들은 감염자들 중 특이 항원 또는 항체가 존재하는 일부 감염자만 진단이 가능하며, 또한 비교적 긴 검사시간을 필요로 한다(21).

최근 HIV 질병과 항 HIV 약물 효능의 표지자로서 폭넓게 사

용되고 있는 HIV의 정량법, 바이러스의 복제 수준의 측정법 등 HIV의 개체정량방법들은 CD4+ 임파구 수의 측정과 같은 기존의 방법들보다 HIV 질병의 비율과 정확성을 더 효과적으로 나타내고 있으며(16), 또한 branched DNA (b-DNA), nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)과 같은 방법들은 HIV 입자의 정량적인 측정을 위해 유용하게 사용되고 있으나(15), 이러한 방법들 모두 HIV의 정량적 모니터링을 위해 몇몇 중간과정을 필수적으로 거쳐야 하기에, 판정까지 필요한 검사시간을 보다 더 단축하여 즉석진단에 이르게 할 수는 없었다.

Real-time PCR을 이용한 직접적인 진단방법은 바이러스나 박테리아 감염을 민감하고, 정확하게 정량할 수 있으며(9), 실시간 모니터링이 가능하여 시간을 단축할 수 있는 새로운 방법으로 인식되고 있으며 다양한 병원체를 대상으로 그 진단방법들이 개발되고 있다. Real-time PCR을 이용한 기존 HIV 진단법연구에서 HIV 검색의 민감성은 최소 1 copy 수준까지 검색할 수 있는 것으로 발전되었으나(16), 보고된 모든 진단법들은 HIV의 감염 및 정량의 판정에 이르기까지 일반적으로 PCR에 소요되는 시간만 1시간 내외가 되는 것으로 나타나 있다(4, 5, 6, 8, 10, 13, 16, 18, 22).

이는 일반적으로 사용되는 real-time PCR 기기가 96 well block을 기반으로 하고 있기에, PCR 중 온도의 변화시간(ramping time)이 상대적으로 느린 것이 중요한 이유이며, 또한 일반적으로 사용되는 20 µl 이상의 PCR 용액의 양도 상대적으로 큰 것이기에 전체 PCR 반응에서 빠른 온도변화를 저해시키는 요인

*To whom correspondence should be addressed.

Tel: 82-31-249-5943, Fax: 82-31-243-1707

E-mail: bsyoon@kyonggi.ac.kr

로 작용하였으며, 용액 내부의 온도 불균형에 의하여 annealing 효과를 감소시킴으로써 비특이적 생산물을 합성하는 요인으로도 지적되었다(14).

PCR에 소요되는 시간을 극단적으로 단축하기 위하여 우선 PCR 기기의 전향적인 개선이 요구되었으며, 이에 따라 신속한 온도 조절을 위하여, 그리고 같은 목적으로 PCR용액의 총량을 1 µl 수준으로 감소시키기 위하여 microchip을 기반으로 한 새로운 real-time PCR 기기가 개발되게 되었다(7).

따라서, 본 연구에서는 열 전도성이 우수한 실리콘 및 유리재질로 제작된 microchip을 기반으로 하는 real-time PCR 기기를 사용하여, AIDS의 진단에서 그 병원체인 HIV를 10분대에 진단, 판정할 수 있는 새로운 초고속 PCR판정법을 개발하고자 하였으며, 또한 이 초고속 진단법이 기존의 real-time PCR법에 비하여 어떤 차이가 있는가를 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

검사용 기질 시료의 설계

HIV는 retrovirus이기에 감염 후 많은 수의 바이러스 복제가 체내에서 일어나며, 그에 따라 다양한 유전적 변이를 일으킨다(24). 따라서 본 연구에서는 미국 생명공학 정보 센터(National Center for Biotechnology Information)에 보고되어 있는 45종의 HIV-1과 33종의 HIV-2의 염기서열 정보를 확보하고 이를 염기서열 비교분석 프로그램인 CLUSTAL X v1.83을 사용하여 비교 분석을 수행하였다. 이 결과로써 각 바이러스군의 유전자 중 가장 상동성의 정도가 높은 염기서열 부분을 추출하게 되었으며, 이는 각기 HIV-1-env495 (495 bp), HIV-2-env294 (294 bp)라 명명하였고, 이를 각기 인공 유전자 합성법을 사용하여 제작하였다.

HIV-1-env495 및 HIV-2-env294의 인공 유전자 합성

인공 유전자 합성법 중 long-nucleotide extension법은 3' 말단이 상보적인 두 개의 long-nucleotide (50-80 mer)를 제작하고, 이들을 기질 및 primer로 PCR을 수행하여 약 100 bp 크기의 DNA 단편을 얻은 후, 이 얻어진 DNA 단편의 양쪽 3' 말단과 상보적인 새로운 long-nucleotide를 primer로 하여 PCR을 수행함으로써 DNA 단편의 길이를 늘려나가며 원하는 염기서열의 DNA를 제작하는 방법이다(2).

HIV-1-env495는 5쌍의 long-nucleotide (50-80mer)를 설계하여 제작하였으며 495 bp 크기의 HIV-1 env 유전자의 일부분이다. HIV-2-env294는 4쌍의 long-nucleotide (50-80mer)를 설계하여 제작하였으며 294 bp 크기의 HIV-2 env 유전자 일부분이다(long-nucleotide 염기서열은 미제시).

일반적 합성과정에서 PCR의 조성은 각각의 long-nucleotide (50-80 mer) 10 pmole, 2.5 mM dNTP, 2.5 µl의 10× PCR buffer (15 mM MgCl₂), 2.5 unit *Taq* polymerase를 첨가하여 최종 25 µl로 반응을 수행하였으며, 반응 조건은 pre-denaturation 94°C, 5분을 수행하고, denaturation 94°C, 30초, annealing 57°C, 30초, extension 72°C, 30초 과정을 30회 반복한 뒤 post-

extension 72°C 10분으로 하였다. 단, 2차의 PCR부터는 각 단계에서 합성된 DNA단편 1 ng을 기질로서 사용하였다.

합성된 각 env 부분 유전자들은 PCR product purification kit (Intron, Korea)를 사용하여 염성분을 제거하였고, T-vector인 pBlueXcm (pBX)에 클로닝하였으며, 염기서열 분석 후, 각기 pBX-HIV1과 pBX-HIV2라 명명하였다(2).

HIV 검색용 primer 제작

HIV-1 및 HIV-2의 PCR 진단을 위하여 HIV-1 및 HIV-2의 검색용 primer를 각기 제작하였다(Table 1). 이들 HIV 검색용 primer는 primer3 v0.2 (7)를 통하여 설계하였으며, VPCR v2.0 (17)을 통하여 HIV 이외의 종에서는 반응하지 않을 것임을 확인하였다. 각 oligonucleotide의 제작은 바이오닉스(Bionics, Korea)사에 의뢰하였다.

PCR 최적조건 확립

PCR 최적조건을 측정하기 위하여 온도 구배 PCR을 수행하였다. HIV-1의 annealing 최적온도를 측정하기 위한 PCR의 조성은 1 ng pBX-HIV1, HIV1-dF/HIV1-dR primer 각각 10 pmole, 1 µl dNTP (each more 2.5mM), 10× PCR buffer (15 mM MgCl₂), 2.5 U *Taq* polymerase (GeneClone, Korea)을 사용하였다. HIV-2는 1 ng pBX-HIV2, HIV2-dF/HIV2-dR primer 각 10 pmole을 사용하였으며 그 외의 조성은 HIV-1의 경우와 동일하게 하였다. Peltier방식의 Thermal Cycler인 PTC-200 (MJ research, USA)을 사용하였고, 94°C 5분간 pre-denaturation을 수행한 후, denaturation 94°C, 30초, annealing 54-66°C, 30초, polymerization 72°C, 30초 과정을 30회 반복하였다. 이후 final-polymerization 72°C, 10분하여 PCR을 완료하였다. PCR산물들은 agarose 전기영동 후 Densitometer (Gene Tools v3.06, Synoptics, England)로 측정하여 최적의 온도조건을 확립하였다.

초고속 실시간 PCR (Ultra rapid Real-time PCR)

초고속 실시간 PCR (Ultra-rapid real-time PCR)은 PCR에 소요되는 총시간을 10분대 또는 그 이하로 종료할 수 있는 실험방법으로, 일반 real-time PCR 방법과 구분하기 위하여 명명되었으며, 김 등(1)의 연구에서 사용된 Quick real-time PCR과 동일한 의미이나, 초고속 PCR로 정확히 번역하고자 재명명하였다.

실험에 사용된 real-time PCR기기는 백금선과 실리콘 microchip을 기반으로 한 Genspector^R TMC-1000 (Samsung, Korea)이며, 이를 이용하여 HIV를 진단할 수 있는 최단 시간을

Table 1. Sequence of HIV env specific detection primers

Name	Sequence(5'-3')	Amplicon	Reference
HIV1-dF	cgcctcaatagccctcagca	117bp	This study
HIV1-dR	ttgggagcagcaggaagcac		
HIV2-dF	cagccagccaacgaaggaac	119bp	This study
HIV2-dR	cccgatcaagaggcgagta		

측정하고자 하였다.

PCR의 조성은 최종 반응액 1 μ l 안에 template DNA인 1 fg pBX-HIV1 (2.3×10^2 copy), 10 pmole HIV1-dF, 10 pmole HIV1-dR, 2 \times greenstar master mix로 조성하였으며 HIV-2에 대하여는 1 fg pBX-HIV2, 10 pmole HIV2-dF, 10 pmole HIV2-dR, 2 \times greensta master mix로 조성하였다. 반응조건은 pre-denaturation 94°C, 30초를 수행하고, denaturation (94°C), annealing (HIV-1, 60°C/ HIV-2, 56°C), extention (72°C) 과정을 40회 반복하였다. cycle내에서의 각 단계(step)별 시간을 15초-15초-15초, 10초-10초-10초, 5초-5초-5초, 3초-3초-3초, 1초-1초-3초로 설정하여 각각 측정하였으며 melting point analysis는 75-90°C구간을 측정하여 Tm값을 결정하였다.

초고속 실시간 PCR에서 민감도 측정

Ultra-rapid real time PCR의 조건하에서 검색할 수 있는 최저 copy 수를 측정하였다. 기질 DNA인 pBX-HIV1의 농도와 copy 수의 상관관계는 기존 연구(9)에서 제시한 관계식에 의해 계산하였으며 본 연구의 모든 copy 수 측정에 적용하였다. HIV-1의 경우, 10 attogram (2.3 copies)에서 10 femtogram (2.3×10^3 copies)까지의 pBX-HIV1을 기질로 사용한 최종 1 μ l의 반응액으로 Ultra-rapid real-time PCR을 수행하였으며, HIV-2의 경우에도 동일한 양의 pBX-HIV2를 사용하였다. 반응조건은 pre-denaturation 94°C 30초를 수행하고, 94°C 1초, 60°C (HIV-1) 또는 56°C (HIV-2) 1초, 72°C 3초 과정을 40회 반복하였다. Melting point analysis는 45-90°C구간을 측정하였다.

초고속 실시간 PCR법과 일반 실시간 PCR법의 비교

본 연구에서 수행한 Ultra-rapid real-time PCR의 정량성을 비교하기 위하여, 기존의 일반적 real-time PCR기기인 Exicycler™ Quantitative Thermal Block (Bioneer, Korea)을 사용하여 각 단계별 설정시간만을 제외한 동일 실험을 수행하고 결과를 비교하였다. Exicycler™ Quantitative Thermal Block을 이용한 real-time

PCR의 조성은 10 attogram (2.3 copies)에서 1 nanogram (2.3×10^8 copies)까지의 pBX-HIV1을 기질로 사용하고, 10 pmole HIV1-dF, 10 pmole HIV1-dR, 2 \times greenstar master mix가 포함된 최종 20 μ l의 반응액을 사용하여 real-time PCR을 수행하였다. HIV-2의 경우 동일한 농도의 pBX-HIV2와 동일한 농도의 HIV2-dF, HIV2-dR primer를 사용하였다. 반응조건은 pre-denaturation 94°C 10분을 수행하고, denaturation 94°C 15초, annealing 60°C (HIV-1) / 56°C (HIV-2) 15초, extention 72°C 15초 과정을 40회 반복하였으며 melting point analysis는 40-94°C 구간에서 측정하였다.

결과 및 고찰

인공 유전자 합성법에 의한 HIV-1-env495 및 HIV-2-env294의 제작

본 연구의 유전자원인 HIV-1-env495 (495 bp), HIV-2-env294 (294 bp)를 각기 인공 유전자 합성법을 사용하여 제작하였으며 각 단계의 합성 산물은 전기영동을 통하여 확인하였다(Fig. 1). 해당 PCR 산물은 각기 T-vector인 pBX에 클로닝한 후 염기서열 결정을 수행하여 정확히 제작되었음을 확인하였다. HIV-1-env495 (495 bp) 및 HIV-2-env294 (294 bp)가 삽입된 클론은 각기 pBX-HIV1과 pBX-HIV2로 명명하였으며, 이들 염기서열들은 보고된 해당 유전자들의 multiple alignment 분석에 의해 추론되고 설계된 것이나, 각기 GenBank의 HIV1 env gene (gi_1184090)의 1949-2443의 서열과 HIV2 env gene (gi_1332355)의 8786-9079의 서열과 동일한 것이었다(Fig. 2).

PCR 최적조건 확립

제작한 검색용 primer의 annealing 최적조건을 확립하기 위하여 pBX-HIV1, pBX-HIV2를 본 PCR실험의 기질로 사용하여 온도 구배 PCR을 실행하였다. 측정된 annealing 온도의 범위는 54°C-66°C이며, 각 2°C 간격으로 동일조건의 PCR을 수행하여

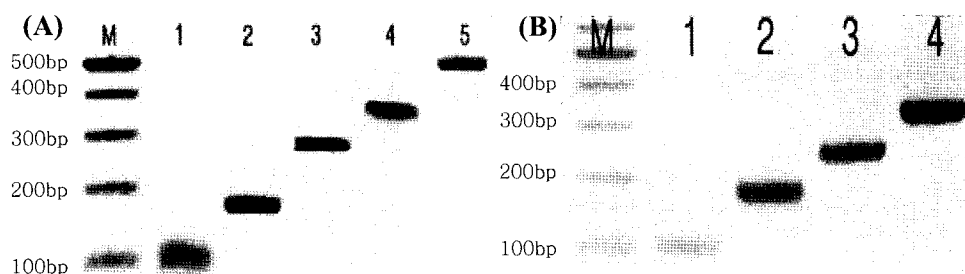


Fig. 1. DNA synthesis of HIV-1 and HIV-2 specific, 495bp(HIV-1) and 294 bp(HIV-2)-long partial env gene(HIV-1 : gi_1332355 / HIV-2 : gi_1184090). A. Target DNA was synthesized through 5-step long-nucleotide extension. Each lane shows the result of each extension step. except lane M (DNA size marker). Lane 1 to lane 5 were 102bp-long, 187bp-long, 281bp-long, 366bp-long and 495bp-long HIV-1 specific partial env gene, respectively. B. Target DNA was synthesized through 4-step long-nucleotide extension. Each lane shows the result of each extension step. Lane 1 to lane 4 were 93bp-long, 167bp-long, 231bp-long and 294bp-long HIV-2 specific partial env gene, respectively.

(A)
 5'-TTATGTTATGCCAAACCAATTCACAAACTTGGCCATTATCTAATTCGAATAAT
 TCTTGTTCATTCTTTCTTGGTGGATCTGCGATTCTTCAATTAGGGTGTATATTGT
 GTTTGTGAATTCCTCAATTTCTTTTCCACATCCAGGTCATGTTATTCCAAAT
 ACTATCCAGAGATTTAATTACTCCAACCTAGTATTCGAAGGCACAGCAGTGGTGC
 GAGTTTCCAGAGCAACCCCAATCCCATGAGCTGTTGATCCCTTAGGTATCTTTC
 CACAGCCAGGACTCTTGCCCTGGAGCTGCTTGTAGCCGAGACTGTGAGTTGCAACAT
 ATGCTGTTGGCCCTCAATAGCCCTCAGCAAATGTTTGTCTGTTGCACTATACCAGA
 CAATAATTGCTGGCCCTGACCGTCACTGTCATTTGACGCTGCGCCATAGTGCCTCC
 TGCTGCTCCCAAGAACCCAAGGAACAAAGCTCCTATTTCCACTGC-3'

(B)
 5'-GTAGTGAATTTGTTAAGTAGATTAGAAAGGGCTATAGGCCTGTTTCTTCTTCCC
 CCCCCTGTTATCTTCCAACAGATCCATAATCCACAAGGACCGGGGACAGCCAGCCAACGA
 AGGAACAGAGAAGACGTCGGAGGCGACAGTGGTTACGACTTGTGGCCTTGGCCAAT
 AAACATATGTCAGTTCCTGATCCACCTACTGACTCGCCTCTTGTATCGGGCTATACAA
 CATCTGCAGAGACTTACTATCCAAGAACTCCCGACCCGCGACTGATCTCCAGAG
 TCTAACAGCA-3'

Fig. 2. The nucleotide sequence of HIV specific, partial *env* genes. (A) HIV-1 sepecific 495 bp-long, partial *env* gene (1949-2443 in GenBank gi_1184090). (B) HIV-2 sepecific 294 bp-long, partial *env* gene (8786-9079 in GenBank gi_1332355). The bold letters in each panel represent two position of HIV-1 or HIV-2 specific detection primers pairs named HIV1-dF and HIV1-dR. or HIV2-dF and HIV2-dR, respectively.

최대산물을 생산하는 annealing온도를 결정하였다. PCR 결과 HIV-1 (117 bp), HIV-2 (119 bp)의 증폭산물을 확인할 수 있었고(Fig. 3A and B), 과 Densitormeter인 Gene Tools v3.06 (Synoptics, England)로 측정 결과 HIV-1의 경우 60°C, HIV-2의 경우 56°C에서 가장 높은 값을 보여(Fig. 3C) 이들을 각기 최적 annealing 온도로 판단하였다.

초고속 실시간 PCR (Ultra rapid Real-time PCR)을 위한 단계별 시간의 단축

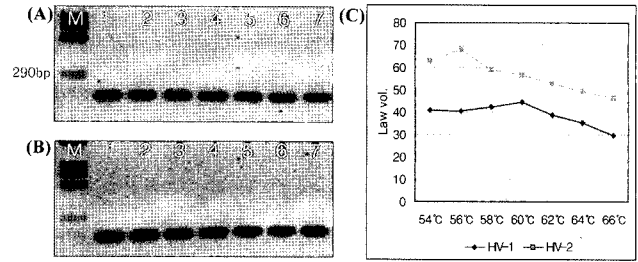


Fig. 3. Temperature-gradient PCRs for HIV-1 and HIV-2 detection. (A) HIV-1 specific PCR. (B) HIV-2 specific PCR. Lane M is DNA size maker, 2.84 kb, 1.39 kb, 1.08 kb, 0.82 kb, 0.29 kb and 0.08 kb. Lane 1 to lane 7 were HIV-1 specific PCR-products (117bp) or HIV-2 specific PCR-products (119 bp) with annealing temperature of 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66°C, respectively. (C) Densities of each HIV-specific PCR-products. Optinum annealing temperature were deduced 60°C for HIV-1 specific PCR and 56°C for HIV-2 PCR.

pBX-HIV1와 pBX-HIV2 각 1 fg (2.3×10² copies)을 초기 기질로 사용하여 초고속 실시간 PCR의 가능성을 시험하였다. 사용된 기기는 Genespector^R TMC-1000 (Samsung, Korea)이며, 이 기기에서 설정할 수 있는 각 단계별 최소 시간인 denaturation (94°C), 1초, annealing (60°C 또는 56°C), 1초, extention (72°C), 3초의 수준까지, 즉, 각 단계(step)를 15초-15초-15초에서 부터 점차로 시간의 설정을 줄여 최종 1초-1초-3초까지 PCR을 수행하여 해당 유전자의 증폭여부를 측정하였다.

결과로써 최소 설정가능 시간인 각 단계별 1초-1초-3초의 PCR에서도 pBX-HIV1와 pBX-HIV2의 해당유전자 부위가 정확히 증폭됨을 확인할 수 있었으며, PCR 후 용점분석시간까지를 포함하여 HIV-1의 경우 40회전의 PCR이 13분 15초, HIV-2의 경우 40회전의 PCR이 14분 48초 만에 검색이 완료되는 것을 확인하였

Table 2. Results of Ultra-rapid real-time PCR for HIV detection.

Type (Initial template)	Time in seconds			Elapsed time	Ct value	Tm value
	Den. ^a	Ann. ^b	Ext. ^c			
HIV1 (1 fg)	15	15	15	38:35	29.29	85.46
	10	10	10	31:54	27.98	84.74
	5	5	5	21:51	27.98	84.71
	3	3	3	17:06	29.49	84.90
	1	1	3	13:15	34.56	85.60
HIV 2 (1 fg)	15	15	15	45:02	26.35	85.36
	10	10	10	31:47	28.64	85.63
	5	5	5	22:09	27.85	85.84
	3	3	3	18:18	27.63	85.72
	1	1	3	14:54	28.34	85.64

^aDenaturation time
^bAnnealing time
^cExtention time

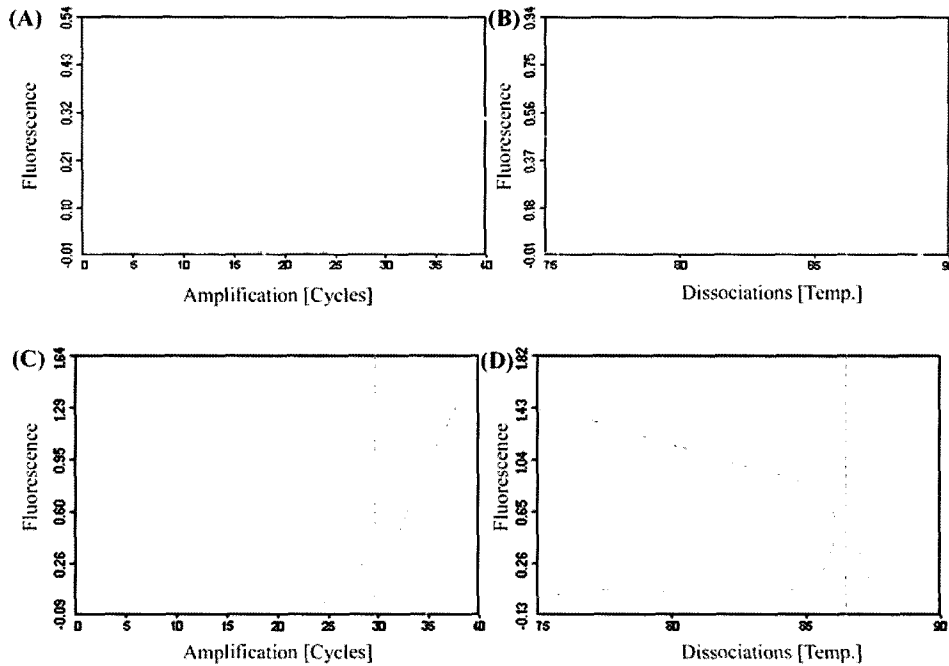


Fig 4. Ultra-rapid real-time PCR for the amplification of HIV specific *env* gene. Ultra-rapid real-time PCR was performed with minimum time of each 3 steps (denaturation, annealing and polymerization) and 40 cycles. Each time of 3 steps was 1, 1 and 3 seconds, respectively. (A) HIV-1 specific, Ultra-rapid real-time PCR. Total detection-time was calculated 13 minutes and 15 seconds including PCR-amplification and melting temperature analysis. Curves of Fluorescence(F) and -dF/dt were shown in whole 40 cycles. (B) Melting temperature analysis. Reduction of fluorescence(F) and -dF/dt in 75~90°C. (C) HIV-2 specific, Ultra-rapid real-time PCR. Total detection-time was calculated 14 minutes and 48 seconds. Curves of Fluorescence(F) and -dF/dt in whole 40 cycles. (D) Melting temperature analysis. Fluorescence(F) and -dF/dt in 75~90°C.

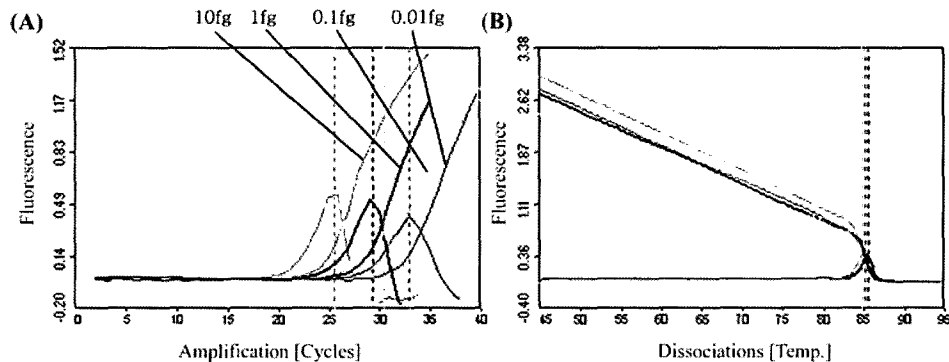


Fig. 5. The sensitivity of HIV-1 ultra-rapid real-time PCR. Ultra-rapid real-time PCR were performed with 10-fold serially diluted initial template DNA. (A) The fluorescence(F) curve of each PCRs ranging from 0.01 fg (2.3 copies) to 10 fg (2.3×10^3 copies) initial HIV-1 template and each curve of -dF/dt were shown. The CT values were calculated from the curves of -dF/dt. (B) Melting temperature analysis in 45°C - 95°C. Tm values were calculated at $85.1 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

다(Fig. 4).

또한 Ultra-rapid real-time PCR에서 각 단계별 설정시간에 따른 각각의 총 소요시간(융점분석시간 포함), CT (Threshold Cycles)값 및 Tm (Temperature of mid-point)값은 Table 2에 나타내었다.

각 단계별 설정시간의 감소는 HIV-1, HIV-2 모두에서 총소요시간의 확실한 감소를 보임으로, 초고속 실시간 PCR이 가능함을 보여주었다. 한편 HIV-1의 경우 annealing 온도가 60°C, HIV-2의

경우 56°C로 차이를 주었기에, 총소요시간은 HIV-1의 것들이 HIV-2의 것들 보다 상대적으로 짧게 나타났으며, 이는 HIV-2가 HIV-1에 비하여 40회전의 각 annealing단계에서 4°C 더 낮은 온도로 온도이동을 수행하였기 때문으로 해석되었다(대조실험결과 미제시). 이는 초고속 PCR을 설계함에 있어, primer 염기서열의 높은 GC%가 최소한 총소요시간의 단축에서는 보다 유리할 것임을 시사하고 있다.

한편, 각 단계별 설정시간의 축소에 따른 CT값의 정량적 감소

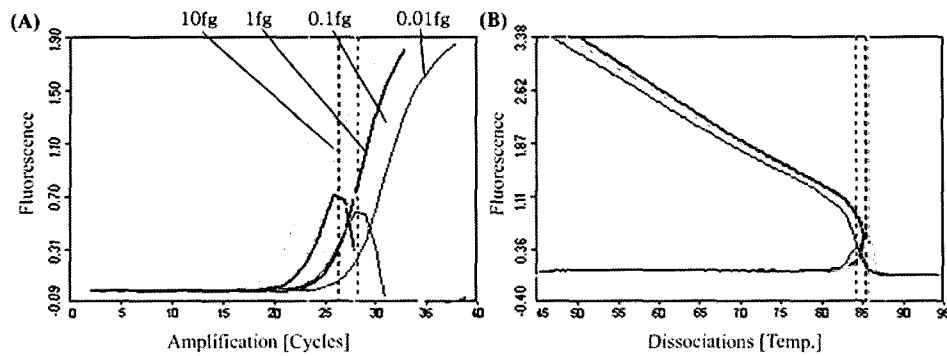


Fig. 6. The sensitivity of HIV-2 ultra-rapid real-time PCR. Ultra-rapid real-time PCR were performed with 10-fold serially diluted initial template DNA. (A) The fluorescence(F) curve of each PCR ranging from 0.01 fg (2.3 copies) to 10 fg (2.3×10^3 copies) initial HIV-2 template and each curve of $-dF/dt$ were shown. The CT values were calculated from the curves of $-dF/dt$. (B) Melting temperature analysis in 45°C - 95°C. Tm values were calculated at $85.6 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

는 발견되지 아니하였으며, HIV-1 및 HIV-2 모두에서 CT값은 감소하다가 다시 증가되는 것이 관찰되었다. 또한 그 감소 후 증가의 양상도 HIV-1과 HIV-2의 경우가 동일하지 아니하였으며, 즉 HIV-1의 경우 최소 CT값인 27.98회전이 단계별 설정시간 10초-10초-10초 및 5초-5초-5초에서 동일하게 측정되었으나, HIV-2의 경우 최소 CT값인 27.63회전이 단계별 설정시간 3초-3초-3초에서 측정되었다. 이러한 양상의 차이의 원인은 아직 규명하지 못하였으나, 각 단계별 충분한 설정시간을 주는 것이 PCR에서 결코 유리한 것이 아닌 사실은 매우 흥미롭다 할 것이다.

또한 melting point analysis에서 Tm (Temperature of midpoint)값은 HIV-1의 경우 $85.2(\pm 0.4)^\circ\text{C}$ 로, HIV-2의 경우 $85.6(\pm 0.3)^\circ\text{C}$ 로 측정되었으며, 모두 전기영동 결과에서 동일한 크기의 PCR 산물이 생성됨을 확인하였으며, Tm값간의 미세한 변화와 CT값 또는 형광강도간에서 규칙성은 발견할 수 없었다(자료 미제시).

초고속 실시간 PCR에서 민감도 측정

Ultra-rapid real-time PCR의 단계별 최소시간(1초-1초-3초)이 확인되었기에, 이를 기준으로 하여, 기질의 양 또는 기질 유전자의 copy수에 따른 초고속 실시간 PCR을 수행하여 이 조건에서 template의 검출 한계(민감도)를 측정하였다. 기질의 양은 pBX-HIV1과 pBX-HIV2를 각 10 ag, 100 ag, 1 fg, 10 fg씩 사용하여 초고속 실시간 PCR을 수행하였으며, 이를 각 해당 유전자의 copy개수로 계산하면, 각 2.3개, 23개, 230개 그리고 2.3×10^3 개가 된다. 민감도 측정에 사용된 real-time PCR 기기도 초고속이 가능한 Genspector[®] TMC-1000 (Samsung, Korea)을 사용하였다.

민감도 측정의 결과는 HIV-1과 HIV-2 모두에서, 주어진 10 fg (2.3×10^3 copies), 1 fg (2.3×10^2 copies), 0.1 fg (2.3×10^1 copies), 0.01 fg (2.3 copies)의 모든 반응에서 형광값이 증가되어 특이 유전자의 존재여부에 대한 검색이 가능한 것으로 확인되었다. 이는 초고속 실시간 PCR에서도 일반 실시간 PCR의 최고수준의 민감도를 보여줄 수 있음을 증명하는 것으로, 초고속 PCR이 일반 PCR에 비하여 동등한 민감도를 갖출 수 있음을 보여준 것이다

하였다(Fig. 5 and 6).

정량 PCR의 측면에서 분석할 때, HIV-1과 HIV-2 모두에서 CT값은 초기기질농도(양)가 낮을수록 정량적으로 증가되는 것이 확인하였으나, 10 및 100 attogram (2.3 및 23 개 유전자) 범위에서의 정량은 다소 불안정한 것으로 측정되었다(Fig. 5A and 6A). 또한 PCR산물에 대한 정성적 측정의 방법인 용융분석(melting point analysis)에서 Tm값은 HIV-1의 경우 $85.1(\pm 0.6)^\circ\text{C}$ 로 측정되었으며, HIV-2는 $85.5(\pm 0.6)^\circ\text{C}$ 로 측정되었다(Fig. 5B and 6B). Tm의 값 중 극미량(2.3개 유전자)에 대한 초고속 실시간 PCR에서 HIV-1 및 HIV-2의 Tm 값들은 모두 상대적으로 낮게 측정되었으나, 전기영동의 결과에서 회박하나 해당 유전자의 동일한 크기의 PCR 산물이 발견됨에 따라, PCR 조성에서 다량 첨가시킨 primer가 PCR증폭에 참여하지 못하고 용융점분석에서 Tm의 측정에 영향을 미친 것으로 해석하였다. PCR산물의 정성적 면을 평가하는 용융점분석에서 소량의 증폭된 DNA 산물과 다량의 잔류 primer가 Tm에 미치는 영향은 향후 보다 엄밀하게 분석되어야 할 것이며, 초고속 실시간 PCR에서 이에 따른 보정이 이루어져야 할 것으로 생각되었다.

초고속 실시간 PCR법과 일반 실시간 PCR법의 비교

본 연구에서 제시하는 Ultra-rapid real-time PCR과 일반 Real-Time PCR의 정량성을 비교하기 위하여, 일반 real-time PCR 기기인 Exicycler[™] Quantitative Thermal Block (Bioneer, Korea)을 사용하여 동일한 실험을 수행하고 초고속 실시간 PCR의 장단점을 추론하였다. 여기서 초고속 실시간 PCR은 PCR의 각 단계, 즉 denaturation, annealing 및 extension의 시간을 각 1초-1초-3초로 설정한 것을 말하며, 일반 실시간 PCR이란 Thermal block의 특성상 온도의 변화에 신속히 대응하지 못하기에 이를 각 15초-15초로 설정한 것이다.

일반 실시간 PCR법에 사용된 기질의 양은 PCR 조성에서 충분한 volume을 사용할 수 있기에 pBX-HIV1과 pBX-HIV2를 각 10 ag, 100 ag, 1 fg, 10 fg, 100 fg, 1 pg, 10 pg, 100 pg, 1 ng씩 사용하였으며, 이를 각 해당 유전자의 copy개수로 계산하면,

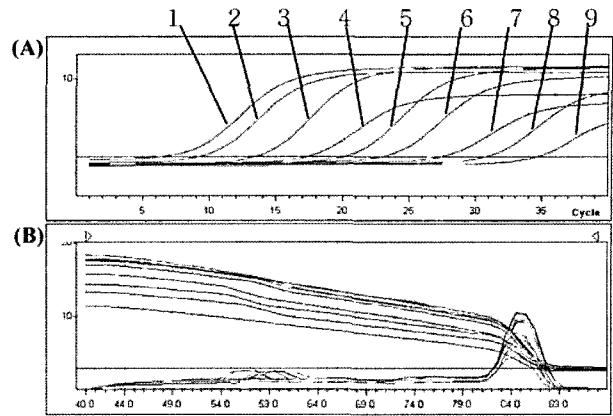
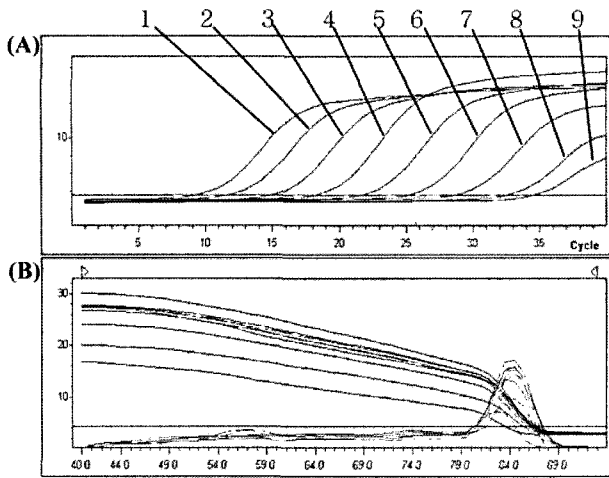


Fig. 7. Real-Time PCR with serially diluted initial templates of HIV-1 *env* gene by Exicycler™ quantitative thermal cycler. Real-time PCR were performed with 40 cycles and each 15 seconds for each 3 steps (denaturation, annealing and polymerization) in a cycle. (A) The fluorescence curve of each PCRs ranging from 10 ag (2.3 copies) to 1 ng (2.3×10⁸ copies) initial HIV-1 template. Numbers indicate PCRs with different initial template; 1 (1ng), 2 (100 pg), 3 (10 pg), 4 (1 pg), 5 (100 fg), 6 (10 fg), 7 (1 fg), 8 (100 ag) and 9 (10 ag). (B) Melting temperature analysis in 45°C-95°C. T_m values were calculated at 84.5±0.5°C.

Fig. 8. Real-Time PCR with serially diluted initial templates of HIV-2 *env* gene by Exicycler™ quantitative thermal cycler. Real-time PCR were performed with 40 cycles and each 15 seconds for each 3 steps (denaturation, annealing and polymerization) in a cycle. (A) The fluorescence curve of each PCRs ranging from 10 ag (2.3 copies) to 1 ng (2.3×10⁸ copies) initial HIV-1 template. Numbers indicate PCRs with different initial template; 1 (1ng), 2 (100 pg), 3 (10 pg), 4 (1 pg), 5 (100 fg), 6 (10 fg), 7 (1 fg), 8 (100 ag) and 9 (10 ag). (B) Melting temperature analysis in 45°C - 95°C. T_m values were calculated at 85.3±0.5°C.

각 2.3개(10 ag)에서 2.3×10⁸개(1 ng)가 된다.

일반 실시간 PCR을 이용한 민감도 측정에서, HIV-1 및 HIV-2 는 모두 초기 기질의 양이 2.3×10⁸개(1 ng)에서 2.3개(10 ag)에 이르기까지 형광값이 증가되는 것을 확인 할 수 있었으며, 회귀 상수의 값이 HIV-1에 대하여 R²=0.9947로, HIV-2에 대하여는 R²=0.9988로, 정량적으로 우수하게 CT값이 증가하는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 7A and 8A). 이런 넓은 범위의 초기기질의 양을 정량적으로 측정하는 것은 최종 반응액 1 μl 안에서 PCR을 조성하여야 하는 초고속 실시간 PCR법이 감당하기 어려운 것이라 하겠으며, 초미량(10²개의 특정 유전자의 초기기질의 정량을

제한된 일반적인 정량성에서는 일반 실시간 PCR법이 보다 폭넓게 사용될 수 있을 것이라 사료된다.

그러나 동일한 양의 초기기질에 대해 초고속 실시간 PCR과 일반 실시간 PCR법을 비교한 결과, HIV-1과 HIV-2 모두에서 100 ag (2.3×10³개)이하의 초기 기질량의 수준에서는 초고속 실시간 PCR법의 CT값이 일반 실시간 PCR법의 CT값보다 상대적으로 낮게 측정되었으며, 10 fg (2.3×10³개)의 수준에서는 반대로 초고속 실시간 PCR법의 CT값이 일반 실시간 PCR법보다 상대적으로 높은 것으로 측정되었다(Table 3).

특히 HIV-2의 경우 초기기질 2.3개의 특정유전자를 대상으로 한 PCR 증폭에서 초고속 실시간 PCR법은 일반 실시간 PCR법에 비하여 6 cycle 수준의 CT값이 낮게 측정됨을 보였으며, 이

Table 3. Comparison between Ultra-rapid real-time PCR and general real-time PCR using Thermal Block

Target	Weight of initial template (copies)	CT value (cycles)		T _m value (°C)	
		Ultra-rapid	General	Ultra-rapid	General
HIV-1	10fg (2.3×10 ³)	25.59	25.188	85.02	84.33
	1fg (2.3×10 ²)	29.29	28.617	85.46	84.26
	0.1fg (2.3×10 ¹)	30.43	32.665	84.79	84.53
	0.01fg (2.3)	32.98	34.623	84.11	83.09
HIV-2	10fg (2.3×10 ³)	23.40	23.045	85.64	85.33
	1fg (2.3×10 ²)	26.35	27.440	85.36	85.31
	0.1fg (2.3×10 ¹)	27.82	30.782	85.46	85.11
	0.01fg (2.3)	28.28	34.617	84.16	84.98

는 초미량의 초기기질에 대한 PCR 증폭은 오히려 초고속 실시간 PCR법이 보다 유리함을 보여주는 것이라 하겠다. 그러나 초고속 실시간 PCR의 특징인 각 단계별 설정 시간의 축소로 인하여 이런 결과가 나왔다는 해석은 무리가 큰 것으로 추론되며, 오히려 초고속 실시간 PCR법에서 사용된 PCR용액이 1 µl이기에, 같은 양으로 사용된 초기 기질이 일반 PCR법에 비하여 20배의 농축효과를 보이고, 이는 Primer 및 Taq-polymerase분자와 접촉 빈도를 보다 높일 수 있었기 때문으로 설명될 수 있을 것이다.

본 연구에서 제시한 Ultra-rapid real-time PCR을 이용한 HIV-1, HIV-2 신속검색법은 기존의 실시간 PCR법에서 간과되어 왔던 검사시간을 단축할 수 있는 가능성을 보여주었다. 본 검사법에서는 PCR조성 후 15분 이내에 HIV-1 및 HIV-2의 특정유전자를 증폭시켜, 그 존재를 확인할 수 있었으며 또한 검출의 민감성의 면에서도 HIV-1, HIV-2 각기 2.3개의 env 유전자의 존재를 유전자 증폭을 통하여 확인할 수 있을 정도로 높은 민감도를 보여 주었으나 차후 임상시료에서의 검출 실험을 통해 민감도를 증명할 필요성이 있다. 비록 HIV의 진단은 정확성이 필요한 진단 영역이지만 본 연구에서 개발한 초고속 실시간 PCR 진단법은 1차적인 검사를 위해 유용하게 사용될 것으로 사료된다. 또한 이런 초고속 실시간 PCR 진단법은 HIV의 진단 뿐 아니라 다른 바이러스와 같은 병원체의 PCR 진단법에 대해서도 그 빠른 PCR법을 적용한 개선이 이루어 질 수 있을 것이며, 10분이내의 검사를 완료할 수 있도록 발전함으로써 이른바 즉석검사 등에서 활용될 수 있기를 기대한다.

감사의 말

본 연구는 농림부 농림기술개발사업(과제번호105066-03-2-HD120)의 지원과 (주) 진클론 및 (주) 삼성 테크윈의 지원에 의하여 수행되었으며, 지원에 감사드리는 바입니다.

참고문헌

- 김을환, 이동우, '유미선, 한상훈, 윤병수. 2007. ultra-rapid Real-time PCR을 이용한 Avian Influenza Virus subtype H5N1의 신속검출법. 한국미생물학회지 43, 23-30.
- 윤병수, 임윤규, 한상훈. 2005. 분자생물학 연구방법론 III (서적). p. 574. 경기대학교 연구지원팀.
- Arens, M.Q, L.M. Mundy, D. Amsterdam, J.T. Barrett, D. Bigg, D. Bruckner, B. Hanna, H. Prince, T. Purington, T. Hanna, R. Hewitt, C. Kalinka, T. Koppes, S. Maxwell, A. Moe, M. Doymaz, M. Poulter, M.S. Tehrani, L. Simard, D.W. Carmody, J. Vidaver, C. Berger, A.H. Davis, and M.T. Alzona. 2005. Preclinical and clinical performance of the efoora test, a rapid test for detection of human immunodeficiency virus-specific antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2399-2406.
- Benoit, K.M., P. Henrivaux, J. Ruelle, N. Delferriere, M. Bodeus, and P. Goubau. 2005. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) proviral DNA load in purified CD4+ cells by LightCycler Real-time PCR. *BMC Infect. Dis.* 5, 1471-1479.
- Bergroth, T., A. Sonnerborg, and Z. Yun. 2005. Discrimination of lamivudine resistant minor HIV-1 variants by selective real-time PCR. *J. Virol. Methods* 127, 100-107.
- Candotti, D., J. Temple, O.O. Shirley, and J.P. Allain. 2004. Multiplex real-time quantitative RT-PCR assay for hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol. Methods* 118, 39-47.
- Cho, Y.K., J.T. Kim, Y.S. Lee, Y.A. Kim, K. Namkoong, H.K. Lim, K.W. Oh, S.H. Kim, J.I. Han, C.S. Park, Y.E. Pak, C.S. Ki, J.R. Chio, H.K. Myeong, and C. Ko. 2006. Clinical evaluation of micro-scale chip-based PCR system for rapid detection of hepatitis B virus. *Biosens. Bioelectron.* 21, 2161-2169.
- Davide, G., V. Francesca, G. Vitone, G. Elisa, L.P. Michele, and C.R. Maria. 2004. Quantitative detection of human immunodeficiency virus type 1(HIV-1) viral load by SYBR green real-time RT-PCR technique in HIV-1 seropositive patients. *J. Virol. Methods* 115, 183-189.
- Desire, N., A. Dehee, V. Schneider, C. Jacomet, C. Goujon, P.M. Girard, W. Rozenbaum, and J.C. Nicolas. 2001. Quantification of human immunodeficiency virus type 1 proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1303-1310.
- Ghosh, M.K., L. Kuhn, J. West, K. Semrau, D. Decker, D.M. Thea, and G.M. Aldrovandi. 2003. Quantitation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Breast Milk. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2465-2470.
- Guan, M.K., L.C. Hsueh, Y.K. Liang, T.J. Wen, L.C. Julius, H.L. Ming, T.J. Chang, and J.L. Hung. 2006. Development of a quantitative Light Cycler real-time RT-PCR for detection of avian reovirus. *J. Virol. Methods* 133, 6-13.
- Gupta, A. and V.K. Chaudhary. 2006. Bifunctional recombinant fusion proteins for rapid detection of antibodies to both HIV-1 and HIV-2 in whole blood. *BMC Biotechnol.* 6, 1472-1483.
- Luo, W., H. Yang, K. Rathbun, C.P. Pau, and C.Y. Ou. 2005. Detection of human immunodeficiency virus type 1 DNA in dried blood spots by a duplex Real-time PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1851-1857.
- Mello, A.J. 2003. DNA amplification moves on. *Nature* 422, 28-29.
- O'Shea, J., I. Chrystie, R. Cranston, J. Mullen, K. Corbett, G. Murphy, J.V. Parry, A.D. Ruitter, and J. Banatvala. 2000. Problems in the interpretation of HIV-1 viral load assays using commercial reagents. *J. Med. Virol.* 61, 187-194.
- Palmer, S., A.P. Wiegand, F. Maldarelli, H. Bazmi, J.M. Mican, M. Polis, R. L. Dewar, A. Planta, S. Liu, J.A. Metcalf, J.W. Mellors, and M. Coffin. 2003. New Real-Time Reverse Transcriptase-Initiated PCR Assay with Single-Copy Sensitivity for Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA in Plasma. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4531-4536.
- Primer 3. http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
- Rouet, F., D.K. Ekouevi, M.L. Chaix, M. Burgard, A. Inwoley, T.D. Tony, C. Danel, X. Anglaret, V. Leroy, P. Msellati, F. Dabis, and C. Rouzioux. 2005. Transfer and evaluation of an automated, low-cost Real-Time Reverse Transcription-PCR test for diagnosis and monitoring of human immunodeficiency virus type 1 infection in a west African resource-limited setting. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2709-2717.
- Schutten, M., B. Van den Hoogen, M.E. van den Ende, R.A. Grutters, A.D. Osterhaus, and H.G. Niester. 2000. Development of a

- real-time quantitative RT-PCR for the detection of HIV-2 RNA in plasma. *J. Virol. Methods* 88, 81-87.
20. Simon, V., D.D. Ho, and Q.A. Karim. 2006. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *Lancet*. 268, 489-504.
21. Singer, D.E., N. Kiwanuka, D. Serwadda, F. Nalugoda, L. Hird, J.B. Hoover, G. Kigozi, J.A. Malia, E.K. Calero, W. Sateren, M.L. Robb, F.W. Mangen, M. Wawer, R.H. Gray, N. Sewankambo, D.L. Birx, and N.L. Michael. 2005. Use of stored serum from uganda for development and evaluation of a human immunodeficiency virus type 1 testing algorithm involving multiple rapid immunoassays. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5312-5315.
22. Teo, I.A., J.W. Chio, J. Moriese, G. Tayler, and S. Shaunak. 2002. LightCycler qPCR optimisation for low copy number target DNA. *J. Immunol. Methods* 270, 119-133.
23. vPCR. <http://grup.cribi.unipd.it/cgi-bin/mateo/vpcr2.cgi>
- (Received June 4, 2007/Accepted June 27, 2007)

ABSTRACT : Ultra-Rapid Real-Time PCR for the Detection of Human Immunodeficiency Virus (HIV)
Dong-Woo Lee, Eul-Hwan Kim, Mi-Sun Yoo, Sang-Hoon Han, and Byoung-Su Yoon*
 (Department of Life Science, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea)

For the detection of Human Immunodeficiency Virus (HIV), multiple and ultra-rapid real-time PCR methods were developed. The target DNA sequences were deduced from HIV-1 specific 495bp partial *env* gene (gi_1184090) and from HIV-2 specific 294 bp partial *env* gene (gi_1332355), and were synthesized by using PCR-based gene synthesis on the reason of safety. Ultra-rapid real-time PCR was performed by Genspector™ using microchip-based, 1 µl of reaction volume with extremely short time in each 3 step in PCR. The detection including DNA-amplification and melting temperature analysis was completed inner 15 minutes. The HIV-1 specific 117 bp-long and HIV-2 specific 119 bp-long PCR products were successfully amplified from minimum of template, 2.3 molecules of each *env* gene. This kind of real-time PCR was designated as ultra-rapid real-time PCR in this study and it could be applied not only an alternative detection method against HIV, but also other pathogens using PCR-based detection.